

Pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in renal transplant patients

Citation for published version (APA):

Op den Buisch, R. (2007). *Pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in renal transplant patients*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.
<https://doi.org/10.26481/dis.20071025ro>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20071025ro](https://doi.org/10.26481/dis.20071025ro)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

In 2006, a total of 1054 patients were waiting for a donor kidney in the Netherlands, while in the same year only 360 kidney transplantations were performed. Not only the life expectancy but also the quality of life increases enormously after the patient has received a well-functioning donor kidney. However, ten years after transplantation only approximately half of all donor kidneys is still functioning well. The loss of transplanted kidneys is caused by a not well-functioning transplanted kidney (chronic transplant disfunctioning) and more often by the decease of the patient despite a well-functioning transplant kidney. The patients' death is, in that case, often caused by heart and circulation diseases.

However, all patients that receive a donor organ have to cope with a lifelong treatment of immunosuppressants, which all have highly variable pharmacokinetic characteristics and a small therapeutic index. The maintenance immunosuppressive therapy consisted, from 1980 until 1995, of cyclosporine (Neoral®) with corticosteroids and azathiopurin (Immunan®). In 1995 a few new immunosuppressants became available: tacrolimus (Prograf®) a drug which can be used as a cornerstone for the pharmacotherapy, mycophenolate mofetil (Cellcept®) and sirolimus (Rapamune®), which can be used as additive immunosuppressive drugs. When tacrolimus is administered instead of cyclosporine, acute rejections appeared to occur less often. This is the case for corticosteroid-sensitive as well as for corticosteroid-insensitive rejections. Due to the fact that acute rejection and especially corticosteroid-insensitive acute rejection is associated with a higher risk of chronic transplant-disfunction, it was expected that the use of tacrolimus will lead to a better transplantation survival than cyclosporine usage. In the meantime there are strong indications that these expectancies are justified. Furthermore the use of tacrolimus instead of cyclosporine leads to an improvement of several lipoproteins (HDL, LDL) and lipids (triglycerides) in the blood and to a lower blood pressure. These factors are also associated with chronic transplant disfunction and thereby with mortality as a result of heart and circulation diseases after transplantation. However, after using tacrolimus it is also assessed that the incidence of diabetes mellitus after transplantation occurs more often than with the use of cyclosporine. This would, in the end, cancel all the previously mentioned advantages regarding the increased survival of the transplant kidney and the increased survival of the patient.

After in CHAPTER 1 the outline and the aim of this thesis is described, CHAPTER 2 gives a complete review of the tacrolimus metabolism, (absorption, distribution, metabolism and elimination). The high variable pharmacokinetic characteristics of tacrolimus in combination with a small therapeutic index emphasized the need for close monitoring of the tacrolimus blood concentrations. Additionally, CHAPTER 2 describes different methodologies used nowadays to measure the tacrolimus exposure, pharmacokinetic parameters, trough (C_0) levels, abbreviated area under the time tacrolimus concentration curve AUC_{0-12}) or complete 12-hour AUC_{0-12} and the apparatus

used (IMx II or LC-MS/MS). Furthermore, the genetic and non-genetic factors that may play a role on the tacrolimus metabolism are summarized and finally the clinical consequences and impact on a patient with a sub-therapeutic or toxic tacrolimus blood level is discussed.

Before real-time polymerase chain reaction (PCR) can be performed using fluorogenic probes, DNA isolation from the ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) whole blood samples is required. Although several commercial DNA isolation kits are available to extract DNA from whole blood samples, less information is available regarding the extraction efficiency and the quality of the isolated DNA. CHAPTER 3 presents a study that compares three commercially available DNA isolation kits, QIAamp blood mini kit (Qiagen, Leusden, the Netherlands), Roche High Pure DNA Preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), Puregene (Biozyme, Landgraaf, the Netherlands) regarding to their ability to extract DNA from whole blood samples as well as the DNA quality.

In the early nineties, the real-time PCR technology introduced a new dimension in the PCR technology, amplification and detection is possible in one single PCR cup, plate or capillary. The defined cycle threshold (C_t) values can be used to determine the quantity of DNA that is present in the PCR cup, whereas a difference between wild type and variant allele DNA in probe attachment can be used for genotyping using the real-time PCR technology. Due to its speed, less contamination risk, less hands on time and a PCR and detection method in one, real-time PCR has gained an enormous interest among molecular biologists. An application that is used widely in real-time PCR is the fluorescence resonance energy transfer (FRET) methodology. A feature of this real-time PCR FRET technology is that two individual fluorescent probes are complimentary to the PCR product near the polymorphic position. Another characteristic of the FRET technology are the melting curves. After the final cyclus, the generated PCR product is cooled down to a certain temperature after which it is denaturated once more. The double stranded PCR product is heated with a speed of 0.1 to 0.2°C/second until the desired temperature. During this heating procedure the fluorescence signal is measured continuously. If the nucleotide located on the polymorphic position in the sensor probe is complementary to the nucleotide located at the polymorphic position in the multiplied DNA, there is a relatively strong bond between these nucleotides and the fluorescence signal will decrease in strength only at a high temperature. This in contrast to a not complementary nucleotide in the PCR product that will result in a less stable bond and consequently will result in a fluorescence signal decreasing at a lower temperature. By calculating the negative derivative of this decrease in fluorescence signal, a melting peak for the wild type and the variant allele samples is obtained.

Due to the composition of some of the DNA sequence, e.g. a long A/T rich area, it is necessary to design a sensor probe, the probe that covers the polymorphic position, that is long enough in order to obtain a melting temperature that is sufficiently high. As a result of the increased length of such a sensor probe, the influence of the none complementary nucleotide becomes significantly less compared to a shorter sensor

probe. CHAPTER 4 demonstrates that the incorporation of a locked nucleic acid (LNA) significantly improved the genotyping of the PXR A11156C polymorphism. Especially, heterozygotes could be discriminated clearly by showing two melting peaks, whereas the probes without a LNA were not able to separate melting peaks in the melting curve analysis. Therefore, we conclude that a LNA within a sensor probe may improve the discriminating power of FRET assays significantly.

In order to set up a fast and consistent assay for the organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphisms, in CHAPTER 5 rapid speed PCR FRET assays on the LightCycler are developed for these OATP1B1 polymorphisms. A LNA on the polymorphic location within the sensor probe was necessary to discriminate both alleles of the OATP1B1 T521C polymorphism. To confirm the reliability of both real-time PCR FRET assays, these new methods were validated by genotyping 120 samples using a PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay and an allele-specific PCR. The results of the real-time PCR FRET assays were completely in line with the conventional PCR methods, indicating that the real-time PCR FRET assays are appropriate for clinical settings.

In most transplant centres monitoring of the tacrolimus blood concentration is performed by C_0 concentrations after the morning tacrolimus administration. However, conflicting evidence is present regarding the usefulness of these morning tacrolimus C_0 concentrations. Knowing this, several studies recently developed a limited sampling strategy (LSS) for tacrolimus using stepwise multiple regression analysis or Bayesian fitting to predict the AUC_{0-12} as accurate as possible, since the AUC_{0-12} is considered to be the gold standard of measuring the total tacrolimus exposure.

Most of these studies that developed a LSS for tacrolimus used no independent transplant patient population to validate their limited sampling strategies. In CHAPTER 6 several LSS that are recently published, are evaluated using an independent well-characterised stable renal transplant patient population. The performance of 24 LSS in 37 renal transplant patients with known AUC_{0-12} has been evaluated and the results were also compared with the predictability of the trough concentrations, C_0 and C_{12} . The criterion was an absolute prediction error (APE%) that differs less than 15% from the complete AUC_{0-12} . Thirteen of the 18 (72%) LSS based on regression analysis were capable of predicting at least 90% of the 37 individual AUC_{0-12} within an APE of 15%. Predictions based on C_0 and C_{12} and Bayesian fitting were lower than 90%: 62% and 67%, respectively. In contrast to a recent publication we observed no clear differences in the predictive capacities when a LSS was developed, using 12-hour pharmacokinetic profiles recorded from heart or lung transplant recipients in our renal transplant recipients. Therefore, LSS using C_0 , C_2 and/or C_4 are in our opinion a better alternative for the C_0 concentration, used nowadays for monitoring tacrolimus. The different LSS available in current literature for tacrolimus monitoring could generate adequate predictions although cautious evaluation of the reliability of these LSS is mandatory.

Tacrolimus is predominantly metabolised by cytochrome P450 (CYP450) 3A isoenzymes into 13-O-desmethyltacrolimus, which has a neglectable immunosuppressive

activity. CHAPTER 7 and 8 demonstrate in a Chinese and Caucasian renal transplant patient population, that the CYP3A5 A6986G polymorphisms is the most relevant polymorphism present in the CYP450 3A iso-enzyme family, with a significant impact on both the tacrolimus exposure and the daily tacrolimus dose. In CHAPTER 7 the association of CYP3A and ABCB1 polymorphisms with the AUC_{0-12} calculated using a two time point sample strategy is evaluated. The CYP3A and ABCB1 genotypes are determined by real-time PCR FRET assays in 103 Chinese renal transplant recipients and consequently related to their $dnAUC_{0-12}$. A significant allele-dependent effect (Kruskal-Wallis; $P < 0.001$) is observed between the CYP3A5*3 polymorphism and the dose-normalized (dn) AUC_{0-12} . Multiple regression analysis showed that the CYP3A5*3 polymorphism is the most significant independent variable and explained 35% of the dose requirement variability in relation to tacrolimus use. Regarding the ABCB1 G2677T/A and C3435T polymorphisms, a trend is observed between the different genotypes and the $dnAUC_{0-12}$. CHAPTER 8 described two different renal transplant recipient groups which are used to examine the influence of CYP3A and ABCB1 polymorphisms on the daily tacrolimus dose and several pharmacokinetic parameters. In total 63 Caucasian renal transplant recipients divided into 26 early and 37 late post transplant recipients were genotyped for CYP3A and ABCB1 polymorphisms. The pharmacokinetic parameters of tacrolimus were determined for all renal transplant recipients and correlated with their corresponding genotypes. A significant difference in allele frequencies of the CYP3A4*1B ($P = 0.028$) and CYP3A5*1 ($P = 0.022$) alleles was observed between the early and late posttransplant recipient group. Significant higher dnC_0 , $dnAUC_{0-12}$, and dnC_{max} were observed for carriers of the CYP3A5*3 variant allele in both renal transplant patient groups. Except for the daily tacrolimus dose ($P = 0.025$) no significant differences were observed for carriers of the CYP3A4*1B variant allele. Neither the individual ABCB1 polymorphisms nor the ABCB1 haplotypes were associated with any pharmacokinetic parameter. Additionally, in CHAPTER 9 the allele frequency of the CYP3A7*1C variant allele in a Caucasian and a Chinese renal transplant patient population is examined. Since CYP3A7*1C variant alleles were only found among the Caucasian renal transplant recipients only these patients were used to study the association between the CYP3A7*1C variant allele and the different pharmacokinetic parameters for tacrolimus. An allele frequency of respectively 2.8% and 0.0% was found after genotyping 70 Caucasian and 103 Chinese renal transplant recipients for the CYP3A7*1C allele using a real-time PCR FRET assay. Heterozygous carriers of the CYP3A7*1C allele showed no significant lower C_0 levels, AUC_{0-12} or C_{max} for tacrolimus compared to the carriers of the CYP3A7*1 allele. The variant alleles of UGT2B7 polymorphisms G-79A, T-66C and C816T with an allele frequency of respectively, 0.0%, 5.8% and 29.6% showed no significant differences on both the $dnAUC_{0-12}$ and the daily tacrolimus dose compared to carriers of the wild type UGT2B7 alleles when the patients were categorized based on their CYP3A5 A6986G, ABCB1 G2677T/A and ABCB1 C3435T genotype. Despite the fact that tacrolimus is extensively glucuronidated by UGT2B7, according to a previous study, the three relevant

polymorphisms present in the UGT2B7 gene seem to have no influence on the tacrolimus exposure in the Chinese renal transplant population, which is in line regarding the results obtained from the another *in vitro* study.

However, also polymorphisms in genes that are indirectly involved in the tacrolimus metabolism seem to play an important role. The pregnane X receptor (PXR) plays an important role in the regulation of the expression of CYP450 iso-enzymes, 5'-uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymes and the drug transporter ABCB1 which are directly involved in the tacrolimus metabolism. In CHAPTER 11 the influence of four individual PXR polymorphism and PXR haplotypes is examined on the tacrolimus exposure in a Chinese renal transplant population. Individuals carrying a variant allele for the PXR polymorphisms A7635G, C8055T, A11156C and T11193C, associated with increased expression of CYP3A4 or ABCB1, had a lower dnAUC_{0-12} for tacrolimus compared to individuals carrying the wild type variant for these PXR polymorphisms (respectively, Mann-Whitney; $P = 0.038$, $P = 0.088$, $P = 0.038$ and $P = 0.038$). The results in CHAPTER 11 suggests that the four PXR polymorphisms are associated with a strong trend towards a lower dnAUC_{0-12} of tacrolimus which confirms the role of PXR in the CYP3A and ABCB1 expression and thereby on the tacrolimus metabolism. Additionally, CHAPTER 12 describes the influence of both the daily corticosteroid dosage and these four PXR polymorphisms on the different pharmacokinetic tacrolimus parameters in an early and a late Caucasian posttransplant recipient group. However, non-genetic factors like, gender, age, haematocrit and time after transplantation seem also to play a role in the variability of the tacrolimus exposure between renal transplant recipients. Up until now therapeutic drug monitoring of tacrolimus is still performed by measuring C_0 concentrations, although recently several studies point out that a LSS consisting of two or three sample time points within 4 hour after the morning tacrolimus ingestion, gives a significantly better reflection of the complete AUC_{0-12} . In order to decrease the variability in the tacrolimus exposure of transplant recipients it is also recommendable to look for possible drug interactions with tacrolimus and possible interactions with other CYP450 inducers or inhibitors like St. John's wort or grapefruit juice.

Summarized the research presented in this thesis reflects on the comparison of several commercially available DNA isolation kits with respect to their isolation capacities, several real-time PCR FRET assays for different polymorphisms that are designed, optimised and validated in our laboratory and additionally in renal transplant recipients with a different ethnic origin (Caucasian and Chinese) the influence of several genetic (CYP3A, ABCB1, UGT2B7 and PXR polymorphisms) and non-genetic factors (gender, age, haematocrit and time after transplantation) are examined on the tacrolimus exposure using a different methodology to determine the tacrolimus exposure (abbreviated AUC_{0-12} and complete AUC_{0-12}).

Samenvatting

Samenvatting

In 2006 wachtten in Nederland 1054 patiënten op een donornier, terwijl in hetzelfde jaar slechts 360 niertransplantaties werden uitgevoerd. Niet alleen de levensverwachting maar ook de kwaliteit van leven verbetert enorm nadat de patiënt een donornier heeft ontvangen. Echter 10 jaar na transplantatie functioneert nog maar ongeveer de helft van alle donornieren. Het verlies van getransplanteerde nieren wordt veroorzaakt door niet goed functionerende getransplanteerde nieren en nog vaker door het overlijden van de patiënt ondanks een goed functioneerde nier. Het overlijden van deze patiënten wordt vaak veroorzaakt door hart- en vaatziekten. Alle patiënten die een donororgaan ontvangen moeten hun hele leven behandeld worden met immunosuppressiva, die allemaal sterk variërende farmacokinetische karakteristieken en een smalle therapeutische index hebben. De immunosuppressieve onderhoudstherapie bestaat van 1980 tot 1995 uit cyclosporine (Neoral[®]) met corticosteroïden en azathiopurine (Immunan[®]). In 1995 kwamen enkele nieuwe immunosuppressiva beschikbaar: tacrolimus (Prograf[®]) een geneesmiddel dat gebruikt kan worden als een hoeksteen voor de farmacotherapie, mycofenolaat mofetil (Cellcept[®]) en sirolimus (Rapamune[®]), welke gebruikt kunnen worden als aanvullende immunosuppressieve geneesmiddelen. Wanneer in plaats van cyclosporine tacrolimus wordt gegeven komen er minder vaak acute afstotingen voor. Dit is het geval voor zowel corticosteroïd-gevoelige als corticosteroïd-ongevoelige acute afstotingen. Doordat acute afstoting en zeker corticosteroïd-ongevoelige acute afstoting geassocieerd wordt met een hoger risico op chronische transplantaat-disfunctie, was het te verwachten dat het gebruik van tacrolimus zou leiden tot een betere transplantatie overleving dan met cyclosporine gebruik. Ondertussen zijn er sterke aanwijzingen dat deze verwachtingen zijn gerechtvaardigd. Verder leidt het gebruik van tacrolimus, in plaats van cyclosporine tot een verbetering van diverse lipoproteïnen (HDL, LDL) en lipiden (triglyceriden) in het bloed en tot een lagere bloeddruk. Deze factoren zijn ook geassocieerd met chronische transplantaat disfunctie en daardoor met mortaliteit als resultaat van hart- en vaatziekten na transplantatie. Bij tacrolimus gebruik is ook vastgesteld dat de incidentie van diabetes mellitus na transplantatie vaker voorkomt dan bij cyclosporine gebruik. Dit zou uiteindelijk de eerder beschreven voordelen ten aanzien van een vergrote overleving van de getransplanteerde nier en de verhoogde overleving van de patiënt teniet doen. Nadat in HOOFDSTUK 1 het overzicht en het doel van dit proefschrift is beschreven, geeft HOOFDSTUK 2 een compleet overzicht van het tacrolimus metabolisme (absorptie, distributie, metabolisatie en eliminatie). De sterk variërende farmacokinetische karakteristieken van tacrolimus in combinatie met een smalle therapeutische index benadrukt de noodzaak tot het nauwkeurig volgen van de tacrolimus bloed concentraties. Vervolgens beschrijft HOOFDSTUK 2 verschillende methoden die tegenwoordig gebruikt worden om de tacrolimus blootstelling te meten, farmacokinetische parameters, dalspiegels (C_0), verkorte oppervlakte onder de tijd tacrolimus concentratie curve (AUC_{0-12}) of complete 12-uurs AUC_{0-12} en de apparatuur welke gebruikt worden (IMx II of LC-MS/MS) om de tacrolimus spiegels te meten.

Verder zijn de genetische en niet-genetische factoren die een rol zouden kunnen spelen samengevat en tenslotte is er een discussie over de klinische consequenties en de impact van sub-therapeutische of toxische tacrolimus bloedspiegels voor de patiënt.

Voordat de real-time polymerase kettingreactie (PCR) kan worden uitgevoerd, die gebruikmaakt van fluorescentie probes, is DNA isolatie uit ethyleen diamine tetra azijnzuur (EDTA) volbloed monsters vereist. Alhoewel verschillende commerciële DNA isolatie kits beschikbaar zijn om DNA te extraheren uit volbloed monsters, is er weinig informatie beschikbaar ten aanzien van de extractie efficiënties en de kwaliteit van het geïsoleerde DNA. HOOFDSTUK 3 vergelijkt drie commercieel beschikbare DNA isolatie kits, QIAamp blood mini kit (Qiagen, Leusden, Nederland), Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Duitsland) en Puregene (Biozyme, Landgraaf, Nederland) ten aanzien van hun capaciteit om DNA te isoleren uit volbloed monsters en de verkregen DNA kwaliteit. In de begin jaren 90, introduceerde de real-time PCR technologie een nieuwe dimensie binnen de PCR technologie, omdat amplificatie en detectie mogelijk werd in één enkel PCR cupje, plaat of capillair. De gedefinieerde drempel cyclus (C_t) waarde kan gebruikt worden om de DNA kwantiteit, welke aanwezig is in het PCR cupje te bepalen, terwijl een verschil tussen het wild type en variant allel DNA in de probe aanhechting kan worden gebruikt voor genotypering met real-time PCR technologie. Door zijn analysesnelheid, verminderd risico op contaminatie, geringe arbeidstijd en een PCR en detectiemethode in één, heeft real-time PCR een enorme interesse gewekt onder de moleculair biologen. Een toepassing die algemeen wordt gebruikt in de real-time PCR is de "fluorescence resonance energy transfer" (FRET) methodologie. Een kenmerk van deze real-time PCR FRET technologie is dat twee individuele fluorescentie probes complementair zijn aan het PCR product dichtbij de polymorfe positie. Een ander karakteristiek van de FRET technologie zijn de smeltcurves. Na de laatste cyclus, wordt het PCR product nadat het is afgekoeld tot een bepaalde temperatuur nogmaals gedegeneerd. Het dubbelstrengs PCR product wordt verwarmd met een snelheid van 0.1 tot 0.2°C/seconde tot de gewenste temperatuur. Gedurende deze opwarmingsprocedure wordt het fluorescentie-sigitaal continue gemeten. Als het nucleotide dat gepositioneerd is op de polymorfe positie in de sensor probe complementair is aan het nucleotide gepositioneerd in de polymorfe positie in het vermenigvuldigde DNA, is er een relatief sterke binding tussen deze nucleotiden. Het fluorescentiesigitaal zal alleen bij een hoge temperatuur afnemen in sterkte. Dit in tegenstelling tot een niet complementair nucleotide in het PCR product dat een minder stabiele binding tot gevolg heeft en uiteindelijk zal resulteren in een afname in het fluorescentiesigitaal bij een lagere temperatuur. Door het berekenen van de negatieve afgeleide van de afname in dit fluorescentiesigitaal, wordt een smeltpiek voor het wild type en de variant allel monsters verkregen. Door de samenstelling van de DNA sequentie, bijv. een lang A/T rijk gebied, is het noodzakelijk om een sensor probe te ontwerpen, de probe die de polymorfe positie omvat en die lang genoeg is om een voldoende hoge smelttemperatuur te krijgen. Als resultaat van de vergrote lengte van zo'n sensor probe wordt de invloed van het niet complementaire nucleotide significant minder in vergelijking met een kortere sensor probe. HOOFDSTUK 4 toont aan dat het

inbouwen van een “locked nucleic acid” (LNA) het genotyperen van de PXR A11156C polymorfisme significant verbeterde. Vooral heterozygoten zijn duidelijker te onderscheiden door het verschijnen van twee smeltpieken, terwijl de probes zonder een LNA bij een smeltcurve analyse niet in staat zijn om deze smeltpieken te scheiden. Daarom concluderen we dat een LNA binnen een sensor probe het discriminerend vermogen van een FRET assay kan verbeteren. In HOOFDSTUK 5 zijn snelle en consistente assays voor organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorfismen door middel van snelle PCR FRET assays op de LightCycler ontwikkeld. Een LNA op de polymorfe locatie binnen de sensor probe was noodzakelijk om de twee allelen van het OATP1B1 T521C polymorfismen te onderscheiden. Om de betrouwbaarheid van beide real-time PCR FRET assays te bevestigen, werden deze nieuwe methoden gevalideerd door 120 monsters te genotyperen met een PCR “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) assay en een allel-specifieke PCR. De resultaten van de real-time PCR FRET assays komen volledig overeen met de conventionele PCR methoden wat aangeeft dat de real-time PCR FRET assays geschikt zijn voor een klinische omgeving.

In de meeste transplantatie centra wordt het monitoren van de tacrolimus bloed concentraties uitgevoerd met C_0 concentraties na de ochtend tacrolimus inname, ondanks dat er bewijs beschikbaar is dat de bruikbaarheid van deze ochtend tacrolimus C_0 spiegels niet optimaal is. Dit wetende, hebben verschillende studies een “limited sampling strategy (LSS)” ontwikkeld met stapsgewijze multiple regression analysis of Bayesian fitting om de AUC_{0-12} zo nauwkeurig mogelijk te voorspellen. Dit omdat de AUC_{0-12} gezien wordt als de gouden standaard voor het meten van de totale tacrolimus concentratie. Veel van deze studies die een LSS ontwikkelde voor tacrolimus gebruikten geen onafhankelijke transplantatie patiënten populatie om de LSS te valideren. In HOOFDSTUK 6 worden verschillende LSS die recentelijk zijn gepubliceerd geëvalueerd met een onafhankelijke goed gekarakteriseerde stabiele niertransplantatie patiënten populatie. De prestaties van 24 LSS in 37 niertransplantatie patiënten met een bekende AUC_{0-12} is geëvalueerd en de resultaten worden tevens vergeleken met de voorspelbaarheid van de dalspiegels (C_0 en C_{12}). Het criterium was een absolute voorspelbaarheidsfout (APE%) die minder dan 15% verschilt van de complete AUC_{0-12} . Dertien van de 18 (72%) LSS zijn gebaseerd op regressie analyse en in staat om tenminste 90% van de 37 individuele AUC_{0-12} binnen een APE% van 15% te voorspellen. Voorspellingen gebaseerd op C_0 en C_{12} en Bayesian fitting zijn lager dan 90%: respectievelijk, 62% en 67%. In tegenstelling tot een recente publicatie hebben we in onze resultaten geen duidelijke verschillen waargenomen in de voorspellende capaciteiten, wanneer een LSS was ontwikkeld door een studie op basis van 12-uurs farmacokinetische profielen, die opgenomen zijn van hart of long transplantatie patiënten bij validatie in onze niertransplantatie patiënten groep. Daarom zijn LSS met C_0 , C_2 en/of C_4 naar onze mening een beter alternatief voor de C_0 concentratie. De verschillende LSS beschikbaar in de huidige literatuur voor het monitoren van tacrolimus zouden adequate voorspellingen kunnen genereren alhoewel een voorzichtige evaluatie voor de betrouwbaarheid van deze LSS verplicht is. Tacrolimus wordt voornamelijk gemetaboliseerd door cytochroom P450 (CYP450) 3A iso-enzymen in 13-O-desmethyltacrolimus, die een

verwaarloosbare immunosuppressieve activiteit heeft. In de HOOFDSTUK 7 en 8 tonen we in een Chinese en Caucasische niertransplantatie patiënten populatie aan, dat het CYP3A5 A6986G polymorfisme het meest relevante polymorfisme is in de CYP450 3A iso-enzym familie, met een significante impact op zowel de tacrolimus blootstelling als de dagelijkse tacrolimus dosering. In HOOFDSTUK 7 wordt de associatie tussen CYP3A en ABCB1 polymorfismen en de AUC_{0-12} , berekend met een tweetijds punt strategie, geëvalueerd. De CYP3A en ABCB1 genotypes zijn bepaald met real-time PCR FRET assays in 103 Chinese niertransplantatie patiënten en vervolgens gerelateerd aan de dosis genormaliseerde (dn) AUC_{0-12} . Een significant allel-afhankelijk effect (Kruskal-Wallis; $P < 0.001$) is waargenomen tussen het CYP3A5*3 polymorfisme en de $dnAUC_{0-12}$. Multiple regression analyse toonde aan dat het CYP3A5*3 polymorfisme de meest significante onafhankelijke variabele is en 35% van de variabiliteit in de dosering verklaarde in relatie tot het tacrolimus gebruik. Ten aanzien de ABCB1 G2677T/A en C3435T polymorfismen is er een trend waargenomen tussen de verschillende genotypen en de $dnAUC_{0-12}$. HOOFDSTUK 8 beschrijft twee verschillende niertransplantatie patiënten groepen welke worden gebruikt om te onderzoeken wat de invloed is van CYP3A en ABCB1 polymorfisme op de dagelijkse tacrolimus dosering en verschillende farmacokinetische parameters. In totaal zijn 63 Kaukasische niertransplantatie patiënten verdeeld in 26 vroege en 37 late posttransplantatie patiënten gegenotypeerd voor CYP3A en ABCB1 polymorfismen. De farmacokinetische parameters van tacrolimus worden bepaald voor alle niertransplantatie patiënten en gecorreleerd aan hun corresponderende genotypes. Een significant verschil in allel frequenties wordt waargenomen voor CYP3A4*1B ($P = 0.028$) en CYP3A5*1 ($P = 0.022$) allelen tussen de vroege en late posttransplantatie patiënten groep. Significante hogere dnC_0 , $dnAUC_{0-12}$ en dnC_{max} werden waargenomen voor dragers van het CYP3A5*3 variant allel in beide niertransplantatie patiënten groepen. Behalve voor de dagelijkse tacrolimus dosering ($P = 0.025$) werd geen significant verschil waargenomen voor dragers van de CYP3A4*1B variant allel. Zowel de individuele ABCB1 polymorfismen als de ABCB1 haplotypen zijn geassocieerd met iedere farmacokinetische parameter. Vervolgens is in HOOFDSTUK 9 de allel frequentie van het CYP3A7*1C variant allel onderzocht en tevens de invloed van CYP3A7*1C op de verschillende farmacokinetische parameters van tacrolimus. Een allel frequentie van respectievelijk 2.8% en 0.0% werd gevonden na het genotyperen van 70 Kaukasische en 103 Chinese niertransplantatie patiënten voor het CYP3A7*1C variant allel met een real-time PCR FRET assay. Heterozygote dragers van het CYP3A7*1C allel vertoonden geen significant lagere dnC_0 spiegels, $dnAUC_{0-12}$ of dnC_{max} voor tacrolimus in vergelijking met de dragers van het CYP3A7*1 allel. In HOOFDSTUK 10 vertoonden de variant allelen van de UGT2B7 polymorfismen G-79A, T-66C en C816T met een allel frequentie van respectievelijk, 0.0%, 5.8% en 29.6% geen significante verschillen met zowel de $dnAUC_{0-12}$ als de dagelijkse tacrolimus dosering vergeleken met dragers van wild type UGT2B7 allelen wanneer de patiënten worden gecategoriseerd op basis van hun CYP3A5 A6986G, ABCB1 G2677T/A en ABCB1 C3435T genotype. Ondanks het feit dat tacrolimus wordt gegluconideerd door UGT2B7 vertonen de drie relevante polymorfismen in het UGT2B7 gen geen invloed op

de tacrolimus blootstelling in de Chinese niertransplantatie patiënten groep. Hoewel polymorfismen in genen die indirect betrokken zijn bij het tacrolimus metabolisme ook een belangrijke rol schijnen te spelen. De pregnane X receptor (PXR) speelt een belangrijke rol in de expressie regulatie van CYP450 iso-enzymen, 5'-uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymen en de geneesmiddeltransporter ABCB1, welke direct zijn betrokken in het tacrolimus metabolisme. In HOOFDSTUK 11 wordt de invloed van vier individuele PXR polymorfismen en PXR haplotypen onderzocht op de tacrolimus blootstelling in een Chinese niertransplantatie patiënt populatie. Individuen die drager zijn van een variant allel voor de PXR polymorfismen A7635G, C8055T, A11156C en T11193C, worden geassocieerd met een hogere expressie van CYP3A4 of ABCB1 in vergelijking met individuen die drager zijn van de wild type variant (Mann-Whitney; respectievelijk, $P = 0.038$, $P = 0.088$ $P = 0.038$ en $P = 0.038$). De resultaten in HOOFDSTUK 11 suggereren dat de vier PXR polymorfismen geassocieerd zijn met een sterke trend naar een lagere $dnAUC_{0-12}$ van tacrolimus, wat de rol bevestigt van PXR bij de CYP3A en ABCB1 expressie en daardoor ook op het tacrolimus metabolisme. Vervolgens wordt in HOOFDSTUK 12 de invloed van zowel de dagelijkse corticosteroid dosering en deze vier PXR polymorfismen op de verschillende farmacokinetische tacrolimus parameters in een vroege en een late Kaukasische posttransplantatie patiënten groep beschreven. Alhoewel niet genetische factoren zoals geslacht, leeftijd, hematocriet en tijd na transplantatie ook een belangrijke rol schijnen te spelen in de variabiliteit van de tacrolimus blootstelling tussen niertransplantatie patiënten. Tot nu toe wordt het therapeutisch monitoren van tacrolimus nog steeds uitgevoerd door het meten C_0 concentraties, hoewel recentelijk verschillende studies aangeven dat de LSS die bestaan uit twee of drie tijdstippen waarop monster worden afgenomen binnen vier uur na de ochtend tacrolimus inname, een significant betere afspiegeling geeft van de complete AUC_{0-12} . Om de variabiliteit in de tacrolimus blootstelling van de transplantatie patiënten te verlagen is het ook aan te bevelen om te kijken naar mogelijke geneesmiddelinteracties met tacrolimus en mogelijke interacties met andere CYP450 inducers en remmers, zoals St. Janskruid of grapefruitsap.

Samengevat, het onderzoek dat wordt gepresenteerd in dit proefschrift omvat de vergelijking van verschillende commercieel verkrijgbare DNA isolatie kits ten aanzien van hun isolatie capaciteiten, diverse real-time PCR FRET assays voor verschillende polymorfismen werden ontworpen in ons laboratorium, geoptimaliseerd en gevalideerd en verder is in niertransplantatie patiënten van een verschillende etnische oorsprong (Kaukasisch en Chinees) de invloed van verschillende genetische (CYP3A, ABCB1, UGT2B7 en PXR polymorfismen) en niet genetische factoren (geslacht, leeftijd, hematocriet en tijd na transplantatie) onderzocht op de tacrolimus spiegels met verschillende methodologieën om de diverse farmacokinetische parameters voor tacrolimus te bepalen (verkorte AUC_{0-12} en complete AUC_{0-12}).